动 物 学 研 究 2002, Feb. 23 (1): 1-6 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

Drosophila auraria 复合种 *Period* 基因 Thr-Gly 区段的初步研究

刘仲敏[1], 曾庆韬[2], 张亚平[1,3]
(1 中国科学院昆明动物研究所 细胞与分子进化开放研究实验室, 云南 昆明 650223;
2. 湖北大学 生命科学学院, 湖北 武汉 430062)

摘要: 测定了金色果蝇复合种 (*Drosophila auraria* species complex) 5 个姐妹种 (sibling species) 和 *D. rufa* 的 *period* (*per*) 基因的 Thr-Gly 区段序列。该区段序列分析表明: DNA 序列的碱基组成拥有果蝇其他基因的共同特点; 颠换数多于转换数, 两两物种间的颠换率与转换率的总比值为 2~5, 密码子第 3 位的颠换与转换的比值为 2.5~5; 同义替换/异义替换 (Ks/Ka) 值远大于 10, 且有的物种间根本不存在非同义突变, 低的 Ka 值说明该复合种的 *per* 基因 Thr-Gly 区段在进化过程中可能承受着较强的选择压力。运用所得的核苷酸序列构建 *Drosophila auraria* 复合种的系统发育树, 为澄清该类群的系统演化关系提供了新的线索。

关键词: *Drosophila auraria* 复合种; *Period* 基因; Thr-Gly 区段; 系统发生
中图分类号: Q969.462.2; Q754; Q755 **文献标识码**: A **文章编号**: 0254-5853(2002)01-0001-06

Preliminary Studies on the Thr-Gly Region of the *Period* Gene in the *Drosophila auraria* Species Complex

LIU Zhong-min[1], ZENG Qing-tao[2], ZHANG Ya-ping[1,3]
(1. *Laboratory of Cellular and Molecular Evolution, Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming* 650223, *China*; 2. *Hubei University, College of Life Science, Wuhan* 430062, *China*)

Abstract: The Thr-Gly regions of the *period* gene were sequenced in the five sibling species of the *Drosophila auraria* species complex and *D. rufa*. Base composition of the species complex is coherent to that of the other gene in *Drosophila*. The transversions are more than the transitions; the total rate of transversion to transition is 2 to 5 between pairwise species, and the rate of transversion to transition in the third codon is 2.5 to 5. The rate of synonymous (Ks) to non-synonymous (Ka) is far higher than 10. The insynonymous mutation does not exist between some species, the low Ka value indicats that the The-Gly regions in the *period* gene of *Drosophila auraria* species complex have undergone selection pressure in their evolution. The phylogenetic tree from DNA sequences of Thr-Gly regions is important to clarify the phylogenetic relationships of the species complex.

Key words: *Drosophila auraria* species complex; *Period*; Thr-Gly region; Phylogeny

Drosophila auraria 复合种(Kimura, 1987)属于山果蝇亚种组, 黑腹果蝇种组, 水果果蝇亚属(the *montium* species subgroup, the *melanogaster* species group, the subgenus *Sophophora*), 包括 *D. auraria*, *D. biauraria*, *D. subauraria*, *D. triauraria* 和 *D. quadraria*。在实验室可以获得 *Drosophila auraria* 复合种的种间杂交, 说明该复合种具有遗传上的某种连续性, 这一特点使其成为研究物种进化的好材料。为了理解其进化史进而重建其系统发生关系, 许多学者已经对这些种的形态、生化、生态和遗传学

收稿日期: 2001-06-25; 接受日期: 2001-10-17
基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39930100); 中国科学院知识创新工程重要方向资助项目 (KSCX2-1-05)
3. 通讯联系人, E-mail: zhangyp@public.km.yn.cn
3. Corresponding author, E-mail: zhangyp@pubic.km.yn.cn

等方面进行了广泛研究，但其系统发生关系仍然存在争议(Minami，1979；Lee，1974，1985)。Tomaru & Oguma(1994)的研究表明这一复合种的物种特异的求偶歌节律在它的生殖隔离中发挥重要的作用，这就使得运用与求偶歌节律有关的 *period*(*per*)基因来推导其系统发生关系成为可能。

性连锁基因 *per* 是最早被发现可能与果蝇的生物节律有关的基因(Konopa & Benzer，1971)，不仅可以影响果蝇的昼夜节律，而且还与果蝇的求偶歌节律的改变有关(Kyriacou & Hall，1980)。*per* 基因的全序列最初在 *D. melanogaster* 中报道，它编码的 PERIOD 蛋白的一个最显著的特征是在第 5 个外显子中，有一连续的苏氨酸－甘氨酸对重复序列(Thr-Gly)(Critri *et al*.，1987)。Thr-Gly 区段及侧翼区域可能控制果蝇物种特异的求偶歌节律(Yu *et al*.，1987；Kyriacou & Hall，1986；Wheeler *et al*.，1991)。求偶歌节律可能是合子前隔离的一个重要的因素，所以 *per* 基因被称为"种化基因"(Coyen，1992)。最近的研究表明性连锁基因具有较快的进化速率(Tsaur & Wu，1997)；因此对性连锁的 *period* 基因，尤其是对在 *per* 基因中有重要作用的 Thr-Gly 区段进行分析，不仅可能获得 *Drosophila auraria* 复合种系统发生方面的重要信息，而且还可以探讨其 *per* 基因在该区段的进化规律，如分析该复合种 Thr-Gly 区段在进化过程中所承受的选择作用。

1 材料和方法

1.1 材 料

果蝇材料及采集地见表 1。

表 1 *Drosophila auraria* 复合种样品来源
Table 1 Collection location of *Drosophila auraria* species complex samples

种名 Species	采集地 Collection location
D. auraria	日本
D. biauraria	中国长白山
D. quadraria	中国台湾
D. subauraria	日本
D. triauraria	日本
D. rufa	日本

1.2 提取总 DNA

总 DNA 提取参照 Zheng *et al*.(1999)的方法。

1.3 Thr-Gly 区段的扩增与序列测定

总 DNA 按实验室常规方法进行 PCR 扩增。参照已知序列设计引物，Thr-Gly 区段扩增和测序所用的引物如下：5'－GGCAGCAATATACACATGAG－3'(5057～5076，引物对应于 *D. melanogaster* 序列的位置)(Critri *et al*.，1987)；5'－TTCTCCATCTCGTCG-TTGTG－3'(5336～5355)(Peixoto *et al*.，1993)。PCR 的条件为：94℃ 1 min，55～60℃ 1 min，72℃ 1 min，共 38 个循环；循环结束时在 72℃充分延伸 5 min，反应总体积为 50 μL。PCR 产物用小量胶回收试剂盒(上海华舜生物工程有限公司)回收，回收产物直接进行测序分析。每个个体的序列都经过正反 3 次重复测定，以确保结果的准确性。测序试剂采用 BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit 2.0 (ABI)。用 377 全自动序列分析仪(ABI)进行序列分析。

1.4 数据处理

用 DNASTAR 软件包进行排序。运用 DnaSP Ver 3.0 (Rozas & Rozas, 1999) 进行两两序列之间的非同义突变值 (Ka)、同义突变值 (Ks) 以及单倍型的计算。用 Mega (Version 2.0) 软件 (Kumar *et al*., 2000) 计算了碱基组成 (base composition)、转换/颠换比率 (transition/transvertion, Ts/Tv)、核苷酸差异和 Tamura-Nei 双参数距离 (Tamura & Nei, 1993)。

1.5 系统发育分析

在构建系统发育树时，对 *per* 基因 Thr-Gly 区段中的转换和颠换先赋予等同的权值，然后对该区段的缺失插入进行 2 种处理：①忽略涉及缺失插入的区域，②考虑涉及缺失插入的区域，即把一次缺失插入看作一次转换或颠换 (张亚平，1996)。以 *D. rufa* 作为外群，根据加权后的数据，利用 PAUP 4.0b8 软件 (Swofford, 2001) 的邻接法构建系统树，并进行 2000 次重抽样 (Felsentein, 1985)。

2 结 果

2.1 碱基组成

测定了 *Drosophila auraria* 复合种 5 个姐妹种各 1 个个体约 400 bp 的 *per* 基因的 Thr-Gly 区段的 DNA 序列。对该序列分析表明：复合种的核苷酸序列百分差异数为 8.7%，有 62 个变异位点 (图 1)；碱基组成中 C 和 G 的含量为 65.9%～68.4%，而 T 的含量仅为 7.6%。分别分析密码子的 3 个位点发现，第 1 位点的嘌呤含量高于 90%，而第 2、3 位点则都是 C、G 的含量比较高，尤其是第 2 位点的C＋G＞80%，不同物种间的碱基组成特点十

```
                 11111111111111111111111222222222222223333333333344
                 2366677889999001112222233344445556678114455666689223344445680 0
                 1003625470369581470236925801470692840466928124687274501350712 5
D. auraria       TTGCGGCTCACACCTCTGAGAGCGAAGAGAATAGTGTAACTGGAGGGGTGCACACAC-AAGG
D. biauraria     TTGCGTCTATATACTGAAAGAGAACTAAGCTGCTGTGAACTAGCACAGTACACACAC-AAGG
D. triauraria    TTTGAGCAATCACCTGACCGAACTAGGCTCGTCGTT-AACTGGCACGGTGCACACACAAAGG
D. quadraria     TTTGAGCACACTCCTGACTGGACCAAGCTAGTCGTT-AACTGGCAGGGCGCACACACAAAGG
D. subauraria    CGTGATGAAAAGCGACTGGACTGACGGCCA-------CGGAACAAGGACGAGGGGTACGCAC
```

图 1　*Drosophila auraria* 复合种 *period* 基因的 Thr-Gly 区段核苷酸序列变异比较

Fig.1　Nucleotide variances of the Thr-Gly region of the *period* gene in the *Drosophila auraria* species complex

表 2　*Drosophila auraria* 复合种的碱基组成百分含量

Table 2　Percentage of the base composition in the *Drosophila auraria* species complex

种名 Species	密码子位点 Location of codon															
	A	T	C	G	A1	T1	C1	G1	A2	T2	C2	G2	A3	T3	C3	G3
D. auraria	24.7	7.4	32.8	35.1	50.4	3.0	4.4	42.2	8.1	4.4	51.1	36.3	15.6	14.8	43.0	26.7
D. biauraria	25.8	8.3	32.3	33.6	51.5	3.0	4.5	40.9	9.8	4.5	50.8	34.8	15.9	17.4	41.7	25.0
D. quadraria	24.7	7.6	33.8	33.8	51.5	3.0	4.5	40.9	9.1	4.5	50.8	35.6	13.6	15.2	46.2	25.0
D. subauraria	24.6	7.0	33.0	35.4	45.6	5.3	6.1	43.0	8.8	5.3	50.0	36.0	19.3	10.5	43.0	27.2
D. triauraria	24.7	7.8	33.8	33.6	51.5	3.0	4.5	40.9	9.1	4.5	50.8	35.6	13.6	15.9	46.2	24.2

分相似（表 2）。密码子的使用中以 C 或 G 结尾的密码子使用频率比较高。在 Thr-Gly 区段还存在着少量的缺失插入。

2.2　转换和颠换

Drosophila auraria 复合种的核苷酸序列两两对比的碱基转换和颠换数值及其比值，并对密码子第 1、2、3 位的颠换与转换的比值分别进行比较的结果见表 3。表 3 中未列出第 1、2 位不存在转换或颠换的结果。

2.3　同义突变与非同义突变

对 *Drosophila auraria* 复合种 *per* 基因的 Thr-Gly 区段的两两序列间的同义突变和非同义突变比较表明：Ks 均比 Ka 大 10 倍以上，即 Ka 值非常低，甚至有的物种间并不存在非同义突变（表 3）。

2.4　系统发育分析

测定 *Drosophila auraria* 复合种 5 个种以及 1 个外群、共 6 个种的 *per* 基因的 Thr-Gly 区段，并据此所构建的系统发生树的拓扑结构如图 2 所示。

3　讨　论

3.1　碱基组成

Drosophila auraria 复合种 *per* 基因的 Thr-Gly 区段的碱基组成很不平衡，即 C、G 的含量比较高。在密码子的使用上偏向于选择以 C 或 G 结尾的密码子。这些特点与其他果蝇 *per* 基因的外显子和一些高表达基因所具有的特点相似（Sharp *et al*., 1992; Moriyama & Gojobori, 1992）。根据该区段的碱基组成的不均衡性，我们在计算遗传距离时选用 Tamura-Nei（Tamura & Nei, 1993）双参数法。对于此区段的缺失和插入，在构建系统发育树时需要进行一定的处理。

3.2　转换和颠换

总体分析，颠换数多于转换数，A-C 之间的颠换数最高，G-T 之间的颠换数最低，A-G 转换多于 T-C。碱基替换主要发生在密码子的第 3 位，而且颠换发生的频率高于转换，并且随着物种分化时间和差异的增加，颠换数基本上呈现递增的趋势，但是转换数则没有明显的规律。两两物种间 Tv/Ts 的总比值为 2～5，而第 3 位的 Tv/Ts 比值则为 2.5～5。在构建系统发育树时，我们赋予颠换和转换等同的权值。

3.3　同义突变和非同义突变

在进化过程中，突变对核苷酸的同义（Ks）和异义（Ka）的替换率的作用不同，所以估计 Ks 和 Ka 之间的差异是理解分子进化的重要手段（Nei, 1987; Li, 1997）。对于 1 个编码蛋白质的基因而言，功能越重要的区域，非同义突变越容易被自然选择清除，其 Ka 值越低。以往的研究提示，尽管远缘种 *D. melanogaster* 和 *D. pseudoobscura* 之间的 Thr-Gly

表 3 *Drosophila auraria* 复合种的转换和颠换、同义替换和异义替换

Table 3 Transition and transversion, synonymous and nonsynonymous substitution in the *Drosophila auraria* species complex

种名和密码子位点 Species and location of codon	Ts/Tv	AG	TC	Ts	AC	AT	CG	TG	Tv	Ts + Tv	Ks	Ka	Ka/Ks
Dq-Dt	0.3	0	1	1	1	2	1	0	4	5	0.0446	0.0000	0.0000
P3	0.3	0	1	1	1	2	1	0	4	5			
Db-Dt	0.5	5	0	5	3	2	1	4	10	15	0.1174	0.0045	0.0383
P3	0.2	2	0	2	3	2	1	4	10	12			
Da-Dq	0.3	3	1	4	2	4	4	2	12	16	0.1297	0.0000	0.0000
P3	0.3	3	1	4	2	4	4	2	12	16			
Da-Dt	0.2	2	0	2	4	3	4	2	13	15	0.1297	0.0000	0.0000
P1	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
P2	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
P3	0.2	2	0	2	4	3	4	2	13	15			
Db-Dq	0.6	7	1	8	5	3	1	4	13	21	0.1433	0.0045	0.0314
P3	0.4	4	1	5	5	3	1	4	13	18			
Da-Db	0.4	6	0	6	7	3	1	4	15	21	0.1433	0.0045	0.0314
P3	0.2	3	0	3	7	3	1	4	15	18			
Dq-Ds	0.3	8	1	9	10	6	9	4	29	38	0.3149	0.0370	0.0117
P1	0.7	2	0	2	1	2	0	0	3	5			
P2	0.7	2	0	2	2	0	1	0	3	5			
P3	0.2	4	1	5	7	4	8	4	23	28			
Dt-Ds	0.4	8	2	10	9	6	7	2	24	34	0.3314	0.0370	0.0112
P1	0.7	2	0	2	1	2	0	0	3	5			
P2	0.3	1	0	1	2	0	1	0	3	4			
P3	0.4	5	2	7	6	4	6	2	18	25			
Da-Ds	0.5	11	2	13	10	5	7	4	26	39	0.3482	0.0370	0.0106
P1	0.7	2	0	2	1	2	0	0	3	5			
P2	1.0	2	0	2	1	0	1	0	2	4			
P3	0.4	7	2	9	8	3	6	4	21	30			
Db-Ds	0.5	12	2	14	9	7	7	4	27	41	0.3672	0.0417	0.1136
P1	1.0	3	0	3	1	2	0	0	3	6			
P2	1.0	2	0	2	1	0	1	0	2	4			
P3	0.4	7	2	9	7	5	6	4	22	31			

Da: *D. auraria*; Db: *D. biauraria*; Dq: *D. quadraria*; Ds: *D. subauraria*; Dt: *D. triauraria*; Ts: 转换 (Transition); Tv: 颠换 (Transversion); Ks: 同义替换 (Synonymous substitution); Ka: 异义替换 (Nonsynonymous substitution); P1, P2, P3: 第1、2、3位密码子 (The first, second and third codon)。

区段在长度和氨基酸组成上差异很大,但二级结构却基本一致,这一现象说明可能是二级结构的稳定性赋予Thr-Gly区段较强的选择压力,抑制了此区段的非同义突变(Costa *et al*.,1991)。因而 *Drosophila auraria* 复合种 *per* 基因的Thr-Gly区段低的Ka值可能是该区段在这一复合种中具有重要的功能,使其异义位点在功能上受到纯化选择和二级结构的稳定性所赋予较强的选择压力所造成的。

3.4 系统发育分析

Drosophila auraria 复合种具有一些进化上的特点,因而倍受进化学者的钟爱。许多学者在其杂交、形态学、生化、进化和分子水平上进行了大量的研究,但是多数的研究中只包括了这一复合种的部分物种,只在杂交、形态和生化水平上对整个复合种开展了研究。最初是根据雄性外生殖器的差异,主要是据阳茎的特征将此复合种分为 *D. biauraria* 和 *D. subauraria* 与 *D. auraria*、*D. quadradria* 和 *D. triauraria* 两大类。*D. auraria* 首先从后一类中独

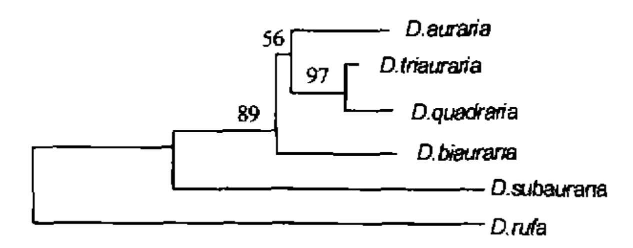


图 2　基于 Thr-Gly 区段采用邻接法（NJ）构建的 *Drosophila auraria* 复合种的分子系统树

Fig.2　Neighbor-joining tree based on the Thr-Gly-encoding DNA in the *Drosophila auraria* species complex

树上的数字是经过 2000 次重复抽样的 bootstrap 值。

The numbers in the tree are the bootstrap probability values based on 2000 replications.

立出来，进而再根据生殖器的其他的特征将各个种分开（张文霞等，1996）。尽管该复合种的每个成员在形态上可以相互区别，但是它们在外部形态结构上的差异非常小，所以很难根据其外部形态特征获得比较准确的系统发生关系（戴灼华和刘凤丽，1994a，b）。

由于形态分类中存在着一定的局限性，所以学者们试图利用其他的研究方法来研究 *Drosophila auraria* 复合种各种之间的亲缘关系，如通过杂交实验。Kimura（1987）对该复合种进行种间杂交实验，然后根据杂交后代中雄性个体的可育性的比率来推导它们之间的亲缘关系。杂交的结果表明，*D. quadradria* 和 *D. triauraria* 杂交获得的后代都是可育的，说明它们之间的亲缘关系非常近，同时发现 *D. triauraria* 和 *D. auraria* 的杂交后代中的可育雄性个体的比例也高于其他的种间杂交后代，这一现象提示它们可能是近缘种，但是杂交的结果中并未表明 *D. biauraria* 和 *D. subauraria* 是近缘种。后来，Kim *et al.*（1989）也在这一复合种之间进行杂交实验，却得到不同的结果，他们的结果表明 *D. quadradria* 是最原始的种，*D. auraria* 是最近才分化出来的，但是没有发现 *D. quadradria* 和 *D. triauraria*，以及 *D. biauraria* 和 *D. subauraria* 是近缘种。这些结果为阐明该复合种的亲缘关系提供了一些线索，但是还存在许多争议。

后来又发现 *Drosophila auraria* 复合种在生化特性上具有较多的差异，于是不同的学者开始采用电泳分析手段研究它的系统发生，应用比较多的是同工酶电泳技术分析。先后有许多人运用 SGE、2DE、PAGE 和 IEF 等电泳方法来推测这一复合种的亲缘关系。不同手段获得的结果具有很大的差异。如 Lee（1988）和 Ohnishi & Watanabe（1984）用同一方法——淀粉凝胶电泳 SGE 技术得到完全相反的实验结果。其他 3 种电泳技术得到的结果基本一致，即这一复合种中的 *D. auraria*、*D. quadradria* 和 *D. triauraria* 聚在一起，而 *D. biauraria* 和 *D. subauraria* 聚为另一个类群（Ohnishi & Watanabe，1983；Lee，1988；戴灼华和刘凤丽，1994a，b）。通过上述的分析可以发现，虽然 *Drosophila auraria* 复合种的亲缘关系的研究已经取得了一定的进展，但尚有许多问题有待于解决，尤其是 *D. biauraria* 和 *D. subauraria* 之间的亲缘关系还存在着一定的分歧。

在利用 *Drosophila auraria* 复合种 *per* 基因的 Thr-Gly 区段构建系统发育树时，由于 *D. rufa* 与 *Drosophila auraria* 复合种的亲缘关系最近且进化级别较低，所以我们选择 *D. rufa* 作为外群（戴灼华和刘凤丽，1994a，b）。用最大简约法构建该复合种的系统树可能会忽略一些有用的信息，因而我们采用距离法进行构树。先赋予 Thr-Gly 区段中的转换和颠换等同的权值，对该区段的缺失插入作 2 种处理：即忽略涉及缺失插入的区域；或者考虑涉及缺失插入的区域，把一次缺失插入看作一次转换或颠换。2 种处理所得树的拓扑结构一致（图 2）。图 2 中的 *D. triauraria* 与 *D. quadradria* 首先聚类在一起，说明它们之间的亲缘关系最近，且有许多实验结果表明这 2 个种可能是同一个种（Bock & Wheeler，1972；Ohnishi & Watanabe，1984；Kimura，1987）。*D. auraria* 与 *D. quadradria* 和 *D. triauraria* 的关系较近，这一结果与以往大部分的研究结果一致（Ohnishi & Watanabe，1983；Kimura，1987；Lee，1988；Kim，1993；张文霞等，1996）。值得注意的是 *D. biauraria* 和 *D. subauraria* 之间的亲缘关系，从形态和同工酶多态的分析结果表明这 2 个种关系最近（Ohnishi & Watanabe，1983；Lee，1988；戴灼华和刘凤丽，1994a，b；张文霞等，1996）；而我们的序列数据显示 *D. subauraria* 最先分化出来，*D. biauraria* 与 *D. subauraria* 的关系并不特别近。有趣的是，Kimura（1987）和 Kim（1989）对 *Drosophila auraria* 复合种的种间杂交实验也未发现 *D. biauraria* 和 *D. subauraria* 之间的亲缘关系较其他种的近。看来，要彻底澄清 *Drosophila auraria* 复合种的系统关系还需要进一步的工作。

致谢：感谢日本北海道大学的Toda教授和日本东京都立大学的Aotsuka教授的帮助，部分实验材料由Aotsuka教授提供；凌发瑶和金碧华老师帮助培养果蝇样品；青岛海洋大学的高天翔老师、本实验室杨勇、罗静、吕雪梅、庞峻峰、王晓霞、罗怀容、李海鹏、施鹏等同志在本文写作过程中参与了有益的探讨并给予了指导；本实验室苟世康、禹一川等老师对实验工作给予了大力支持和帮助。

参考文献：

Bock I R, Wheeler M R. 1972. The *Drosophila melanogaster* Species Group[Z]. Austin: Univ. Texas Publ. **7213**: 1 - 102.

Costa R, Peixoto A A, Thackeray J R, *et al*. 1991. Length polymorphism in the Threonine-Glycine encoding repeat region of the *period* gene in *Drosophila*[J]. *J. Mol. Evol.*, **32**: 238 - 246.

Coyen J A. 1992. Genetics and speciation[J]. *Nature*, **355**: 511 - 515.

Citri Y, Colot H V, Jacqier A C, *et al*. 1987. A family of unusually spliced biologically active transcripts encoded by a *Drosophila* clock gene[J]. *Nature*, **326**: 42 - 47.

Dai Z H, Liu F L. 1994a. Study on evolution genetics of *Drosophila auraria* species complex-cladistic analysis and phenetic analysis (Ⅰ)[J]. *Acta Genetica Sinica*, **21**(5): 362 - 372. [戴灼华, 刘凤丽. 1994a. *Drosophila auraria*复合种的进化遗传学研究(上). 遗传学报, **21**(5): 362 - 372.]

Dai Z H, Liu F L. 1994b. Study on evolution genetics of *Drosophila auraria* species complex-cladistic analysis and phenetic analysis (Ⅱ)[J]. *Acta Genetica Sinica*, **21**(5): 436 - 440. [戴灼华, 刘凤丽. 1994 *Drosophila auraria*复合种的进化遗传学研究(下). 遗传学报, **21**(6): 436 - 440.]

Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using bootstrap[J]. *Evolution*, **39**: 783 - 791.

Kim B K, Watanabe T K, Kitagawa O. 1989. Evolutionary genetics of the *Drosophila montium* subgroup: Ⅰ. Reproduction isolation and the phylogeny[J]. *Jpn. J. Genet.*, **64**: 177 - 190.

Kim B K, Aotsuka T, Kitagawa O. 1993. Evolutionary genetics of the *Drosophila montium* subgroup: Ⅱ. Mitochondrial DNA variation[J]. *Zool. Sci.*, **10**: 991 - 996.

Kimura M T. 1987. Habitat differentiation and speciation in the *Drosophila auraria* species-complex (Diptera, Drosophilidae)[J]. *Kontyu*, **55**: 429 - 436.

Konopa R J, Benzer S. 1971. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**: 2112 - 2116

Kumar S, Tamura K, Nei M. 2000. MEGA2.0: Molecular evolutionary genetics analysis[CP]. Ver. 2.0. University Park: the Pennsylvania State University.

Kyriacou C P, Hall J C. 1980. Circadian rhythm mutations in *Drosophila melanogaster* affect short term fluctuations in the males courtship song[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**: 6929 - 6933.

Kyriacou C P, Hall J C. 1986. Interspecific genetic control of courtship song production and reception in *Drosophila*[J]. *Science*, **232**: 494 - 497

Lee T J. 1974. Speciation in the species complex *Drosophila auraria*[J]. *Jpn. J. Genet.*, **49**: 305.

Lee T J. 1985. Biochemical phylogeny of the *Drosophila auraria* complex[J]. *Korean J. Genet.*, **7**: 184 - 192

Lee T J. 1988. Enzyme polymorphism in four species of the *Drosophila auraria* complex[J]. *Korean J. Genet.*, **10**(4): 253 - 260.

Li W H. 1997. Molecular Evolution[M]. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc, Publishers.

Minamu N. 1979. Niche analysis of three closely related species of the genus *Drosophila*[J]. *Zoology*, **22**: 33 - 41.

Moriyama E N, Gojobori T. 1992. Rates of synonymous substitution and base composition of nuclear genes in *Drosophila*[J]. *Genetics*, **130**: 855 - 864.

Nei M. 1987. Molecular Evolutionary Genetics[M]. New York: Columbia University Press.

Ohnishi S, Watanabe T K. 1983. Biochemical phylogenies of *Drosophila*: protein differences detected by two-dimensional electrophoresis[J]. *Genetica*, **61**(1): 55 - 63.

Ohnishi S, Watanabe T K. 1984. Systematics of the *Drosophila montium* species subgroup: a biochemical approach[J]. *Zool. Sci.*, **1**(5): 801 - 807.

Peixoto A A, Campesan S, Costa R, *et al*. 1993. Molecular evolution of a repetitive region within the *per* gene of *Drosophila*[J]. *Mol. Biol. Evol.*, **10**(1): 127 - 139

Rozas J, Rozas R. 1999. Dnasp: DNA sequence polymorphism[CP]. Ver. 3.0.

Sharp P M, Burgess E, Cowe A T, *et al*. 1992. Selective use of termination codons and variations in codon choice[A]. In: Harfield D L, Byeong J L, Pirtle R M. Transfer RNA in Protein Synthesis[M]. Boca Raton, Florida: CRC Press. 397 - 425.

Swofford D L. 2001. PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony[CP]. Ver. 4.0b8.

Tamura K, Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitution in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees[J]. *Mol. Biol. Evol.*, **10**: 512 - 526.

Tomaru M, Oguma Y. 1994. Differences in courtship song in the species of the *Drosophila auraria* complex[J]. *Anim. Behav.*, **47**: 133 - 140.

Tsaur S C, Wu C I. 1997. Positive selection and the molecular evolution of a gene of male reproduction, Acp26Aa of *Drosophila*[J]. *Mol. Biol. Evol.*, **14**: 544 - 549.

Wheeler D A, Kyriacou C P, Greenacre M L, *et al*. 1991. Molecular transfer of a species-specific behaviour from *Drosophila simulans* to *Drosophila melanogaster*[J]. *Science*, **251**: 1082 - 1085.

Yu Q, Colot H V, Kyriacou C P, *et al*. 1987. Behaviour modification by in vitro mutagenesis of a variable region within the *period* gene of *Drosophila*[J]. *Nature*, **326**: 765 - 769.

Zhang W X, Chen H Z, Peng T X. 1996. Drosophilidae[A]. In: Xue W Q, Zhao J M. Flies of China[M]. Shenyang: Liaoning Scientific and Technological Publishing House. 280 - 409. [张文霞, 陈华中, 彭统序. 1996. 果蝇科. 见: 薛万琦, 赵建铭. 中国蝇类(上) 沈阳: 辽宁科学技术出版社. 280 - 409.]

Zhang Y P. 1996. From the DNA sequences to the species phylogenetic tree[J]. *Zool. Res.*, **17**(3): 247 - 253. [张亚平. 1996. 从DNA序列到物种树. 动物学研究, **17**(3): 247 - 253.]

Zheng X Z, Zhang Y P, Zhu D L, *et al*. 1999. The *period* gene: high conservation of the region coding for the Thr-Gly dipeptides in the *Drosophila nasuta* species subgroup[J]. *J. Mol. Evol.*, **49**: 406 - 410.